

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11) Publication number : 2002-355030

(43) Date of publication of application : 10.12.2002

(51) Int.CI.

C12N 1/20  
A01N 63/02  
//(C12N 1/20  
C12R 1:07 )(21) Application number : 2002-094765 (71) Applicant : CHIBA  
PREFECTURE  
DAINIPPON INK &  
CHEM INC(22) Date of filing : 29.03.2002 (72) Inventor : EBARA TAKESHI  
KIMURA  
MASATOSHI  
NISHIBASHI  
HIDEJI  
FUJIIE AZUSA  
AOYANAGI  
SHINICHI  
HASEGAWA MAKOTO  
TANAKA MASAO  
YOKOYAMA TOMOKO**(54) METHOD FOR PRODUCING SPORANGIUM OF BACILLUS POPILLIAE, CONTROLLING AGENT AND CONTROLLING METHOD****(57) Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for efficiently producing the sporangium including the spore of *Bacillus popilliae* and the parasporal body thereof, having activities for controlling insects of *Scarabaeidae*, and further to provide a controlling agent of the insects of the *Scarabaeidae*, obtained by the production method, and a controlling method.

**SOLUTION:** This method is the one for producing the sporangium including the spore and the parasporal body, having the activities for controlling the insects of the *Scarabaeidae* by culturing the bacteria belonging to the *Bacillus popilliae*. The method comprises culturing the bacteria in a medium containing 0.2-4.0 wt.% glutamic acid and 0.05-0.5 wt.% absorbent. The controlling agent contains the sporangium including the spore of the *Bacillus popilliae* and the parasporal body obtained by the production method as an active ingredient. The controlling method of the insects of the *Scarabaeidae* comprises spraying the controlling agent on the soil in which the insects of the *Scarabaeidae* inhabit.

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-355030

(P2002-355030A)

(43)公開日 平成14年12月10日 (2002.12.10)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>  
 C 12 N 1/20  
 A 01 N 63/02  
 // (C 12 N 1/20  
 C 12 R 1:07)

識別記号

F I  
 C 12 N 1/20  
 A 01 N 63/02  
 C 12 R 1:07

テマコード(参考)  
 A 4B065  
 E 4H011

審査請求 未請求 請求項の数 5 OL (全 15 頁)

(21)出願番号 特願2002-94765(P2002-94765)  
 (22)出願日 平成14年3月29日 (2002.3.29)  
 (31)優先権主張番号 特願2001-99683(P2001-99683)  
 (32)優先日 平成13年3月30日 (2001.3.30)  
 (33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 591014710  
 千葉県  
 千葉県千葉市中央区市場町1番1号  
 (71)出願人 000002886  
 大日本インキ化学工業株式会社  
 東京都板橋区坂下3丁目35番58号  
 (72)発明者 江原 岳  
 千葉県佐倉市白銀1-12-2  
 (72)発明者 木村 雅敏  
 千葉県市原市ちはら台3-32-1-1 ファ  
 ミールハイツ10-502  
 (74)代理人 100088764  
 弁理士 高橋 勝利

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 バチルス・ポビリエの胞子嚢の製造方法、防除剤及び防除方法

## (57)【要約】

【課題】 コガネムシ科昆虫に対し防除効果を有するバチルス・ポビリエの胞子とパラスピラルボディとを含む胞子嚢を効率良く得る製造方法、該製造方法により得られるコガネムシ科昆虫の防除剤及び防除方法を提供すること。

【解決手段】 バチルス・ポビリエに属する菌を培地で培養し胞子とパラスピラルボディとを含む胞子嚢を製造する方法であって、グルタミン酸を0.2~4.0質量%、吸着剤を0.05~0.5質量%含む培地で培養する、コガネムシ科昆虫に対し防除効果を有するバチルス・ポビリエの胞子とパラスピラルボディとを含む胞子嚢の製造方法を提供し、さらには前記製造方法により得られたバチルス・ポビリエの胞子とパラスピラルボディとを含む胞子嚢を有効成分として含有する防除剤及び該防除剤をコガネムシ科昆虫の生息土壤に散布するコガネムシ科昆虫の防除方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 バチルス・ポビリエに属する菌を培地で培養し胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢を製造する方法であって、グルタミン酸を0.2~4.0質量%、吸着剤を0.05~0.5質量%含む培地で培養することを特徴とする、コガネムシ科昆虫に対し防除効果を有するバチルス・ポビリエの胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢の製造方法。

【請求項2】 前記培地がグルタミン酸を培地中の全アミノ酸に対し35~90質量%含む請求項1に記載の胞子嚢の製造方法。

【請求項3】 前記培地が培地中にビルビン酸を含む請求項1に記載の胞子嚢の製造方法。

【請求項4】 請求項1に記載の製造方法により得られたバチルス・ポビリエの胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢を有効成分として含有するコガネムシ科昆虫の防除剤。

【請求項5】 請求項4に記載の防除剤をコガネムシ科昆虫の生息土壤に散布するコガネムシ科昆虫の防除方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、バチルス・ポビリエに属する菌を培地で培養することによるコガネムシ科昆虫に対し防除効果を有するバチルス・ポビリエの胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢の製造方法、コガネムシ科昆虫の防除剤及びコガネムシ科昆虫の防除方法に関する。

【0002】

【従来の技術】コガネムシ科昆虫の幼虫は、芝や農園芸作物や樹木等の広範囲な植物の根を食餌し、多大な被害を与えることが知られている。これらコガネムシ科昆虫の幼虫は地中に棲息するため、地上から散布する化学農薬では防除効果を得にくく、さらに幼虫の棲息場所も特定しにくい。このため広範囲にしかも多量の農薬散布により地中に農薬を浸透させる必要があるため自然環境や人体に対する悪影響が懸念されており、より有効な防除方法が切望されている。

【0003】バチルス・ポビリエに属する菌はコガネムシ科昆虫の幼虫に寄生して乳化病を発病させ、最終的にこれらを死に至らしめることが知られており、化学農薬が効きにくいコガネムシ科昆虫の防除に該菌の胞子嚢を利用しようとする試みは古くから行われてきた。しかしながら、該菌はコガネムシ幼虫の体内では生育するものの、人工培地を用いた培養で生育することは難しく、該菌の胞子嚢を培地で製造することは特に難しかった。また福原は、培地を用いた培養で得た胞子嚢では幼虫の感染、発病が起らないと報告している（福原俊彦著「昆虫病理学」57頁、1979年）。

【0004】例えば、ハイネスらはペプトン0.5%、

酵母エキス1.5%、リン酸水素二カリウム0.3%、グルコース0.1%及び活性炭1%を含む液体培地でバチルス・ポビリエの培養を試み、最大で培養液1ml当たり $2.06 \times 10^7$ 個の胞子嚢が得られる例を報告している（Journal of Invertebrate pathology, 22巻, 377-381頁, 1973年）。しかし、培地に対するグルタミン酸の含有量や全アミノ酸に対するグルタミン酸の割合は不明であり、また、研究者自身もアミノ酸組成は胞子嚢の生産には関係ないと記載している（379頁、第1コラム、19行目）。

【0005】また、ハイネスらは対数増殖後期の成熟した細胞をペプトン（トリプトン）0.5%、酵母エキス1.5%、リン酸水素二カリウム0.3%、グルコース0.1%、活性炭1%を含む液体培地成分でバチルス・ポビリエを培養することで培養液1ml当たり $3.1 \times 10^7$ 個の胞子嚢を得たと報告している（Journal of Invertebrate pathology, 19巻, 125-130頁, 1972年）。しかし、この培養方法は培養時間が長く、2週間程度かかっていた。

【0006】また、米国特許第4824671号には1%可溶性デンプン、0.1%トレハロース、0.5%酵母エキス、0.3%リン酸水素二カリウム、0.1%炭酸カルシウムを含む液体培地で培養し、培養液1ml当たり $1 \times 10^9$ 個の胞子嚢数が得られた例が挙げられている。しかし、この場合も得られた胞子嚢に胞子は有るがパラスボラルボディは存在せず、土壤1kgに $2.0 \times 10^{12}$ 個の割合で胞子嚢を散布し、コガネムシ科昆虫の幼虫に経口摂取させた際の乳化病感染率は7週間で47.59%であり、幼虫体内で形成された胞子嚢に比較してもコガネムシ科昆虫の幼虫に対する殺虫効果は弱かった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、コガネムシ科昆虫に対し防除効果を有するバチルス・ポビリエの胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢を効率良く得る製造方法、該製造方法により得られるコガネムシ科昆虫の防除剤及び防除方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決すべく銳意研究を重ねた結果、コガネムシ科昆虫の効果的な防除には、バチルス・ポビリエの胞子のみでなく、胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢が必要であることを明らかにした。そして該胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢の培養での生産にはグルタミン酸と生育阻害物質を除去すると考えられる吸着剤とを特定濃度添加した培地で培養する必要があることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】即ち、本発明はバチルス・ポビリエに属する菌を培地で培養し胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢を製造する方法であって、グルタミン酸を0.2～4.0質量%、吸着剤を0.05～0.5質量%含む培地で培養することを特徴とする、コガネムシ科昆虫に対し防除効果を有するバチルス・ポビリエの胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢の製造方法を提供するものである。

【0010】また本発明は、前記製造方法により得られたバチルス・ポビリエの胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢を有効成分として含有するコガネムシ科昆虫の防除剤及び該防除剤をコガネムシ科昆虫の生息土壤に散布するコガネムシ科昆虫の防除方法を提供するものである。

#### 【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明で用いるバチルス・ポビリエ (*Bacillus popilliae*) に属する菌の細菌学的性質は、バージェイズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) によれば、形態的性質は長さが1.3～5.2μm、幅が0.5～0.8μmのグラム陰性桿菌であり、生育温度は20～35°Cで胞子嚢の中に胞子とパラスボラルボディとを有する。

【0012】バチルス・ポビリエに属する菌の胞子嚢は、図1に示す模式図の如く、胞子とパラスボラルボディ（又は副胞子小体）と呼ばれる小体を含む嚢である。しかし、従来の培地を用いたバチルス・ポビリエの培養方法に関する文献では、胞子嚢と胞子とが明確な区別なく用いられている例が多く、文献中の「胞子」という言葉が胞子のみを意味するのか、胞子のみを含む胞子嚢を意味するのか、あるいは胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢なのか不明確であった。本発明者らは昆虫、特にコガネムシ科昆虫の殺虫若しくは幼虫の生育阻害による防除効果をあたえるためには胞子とパラスボラルボディとが必要であることを明らかにした。

【0013】近年、これまでの菌株も含めバチルス・ポビリエは、パエニバチルス・ポビリエ (*Paenibacillus popilliae*) に再分類されるべきとのバターソンらの学説上の見解も示されており (Int. J. Syst. Bacteriol., 49巻, 1999年, 531～540頁)、現段階では名称の扱いが明確になっていない。よって、本発明においては、バチルス・ポビリエに属する菌とはパエニバチルス・ポビリエに属する菌をも包含するものとする。

【0014】本発明の製造方法に用いる培地は生育を阻害する物質の除去を目的とした吸着剤を含む。該吸着剤としては活性炭、吸着樹脂、アロフォサイト又はモレキュラーシーブ等が挙げられる。生育阻害物質の主たるも

のは過酸化水素であると考えられ、吸着剤は過酸化水素分解能若しくは過酸化水素除去能を有するものが好ましく、具体的には活性炭が好ましく挙げられる。

【0015】本発明に用いる活性炭の形状は、粉末状、粒状又はシート状等が挙げられ、いずれも使用できるが優れた菌の増殖及び胞子嚢化率を示すことから特に粉末状の活性炭が好ましい。

【0016】本発明でいう吸着樹脂は、微細物質を吸着する多孔質重合体を意味し、例えば粒子状に成型された架橋性多孔質重合体で、粒子内部にまで達する細孔構造により水溶液中の微細物質を効率よく吸着しうる合成樹脂である。具体的には、三菱化学社製芳香族系合成樹脂吸着剤DIAION HP20、DIAION HP21、SEPABEADS SP825、SEPABEADS SP850、SEPABEADS SP70、SEPABEADS SP700、置換芳香族系合成樹脂吸着剤SEPABEADS SP207、アクリル系合成樹脂吸着剤DIAION HP2MGなどを挙げることができる。

【0017】本発明に用いる培地中の吸着剤の濃度は、本発明の効果を達成する範囲であれば特に限定されないが、培地に対して0.05～5質量%が好ましい。0.05質量%以上であれば菌の生育阻害物質の吸着、除去効果を十分發揮し、5%以下であれば菌の増殖に必要な栄養源の吸着も少ないため、該範囲内で優れた菌の増殖促進効果を呈する。本発明に用いる吸着剤の添加方法としては殺菌前の培地中に添加しても良いし、殺菌後の培地に添加しても良い。

【0018】本発明で言うグルタミン酸にはその生理学的に許容される塩も含まれる。具体的にはグルタミン酸ナトリウム、グルタミン酸カリウム、グルタミン酸アンモニウム、グルタミン酸塩酸塩等が挙げられる。これらの培地中の濃度はグルタミン酸として0.2～4.0質量%であり、より優れた菌の増殖及び胞子嚢化率を呈する点で0.4～1.0質量%が好ましい。

【0019】本発明に用いる培地には、グルタミン酸以外にも通常の微生物培養に必要とされる窒素源が添加されていることが好ましい。窒素源としては、通常、微生物の培養に用いられるペプトン、肉エキス、魚肉エキス、ラクトアルブミン水解物又は酵母エキス等の有機性窒素源が挙げられる。それ以外の窒素源として、アンモニア、硝酸及びそれらの塩等の無機窒素源が挙げられる。本発明に用いる窒素源の培地中の濃度は5.0質量%以下であることが好ましく、より優れた菌の増殖促進効果を呈することから0.2～4.0質量%が好ましい。

【0020】窒素源中には各種のアミノ酸が含まれており、窒素源を添加することで結果的に培地中にグルタミン酸を添加することになる。従って、該窒素源の添加量を増やすことでもグルタミン酸の濃度を高めることができ

きるが、その方法では結果的に胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢を形成することはできない。これは窒素源中に含まれる生育阻害物質やその他不必要な成分濃度も同時に高まるためと推測される。そのため、培地中の全アミノ酸に対するグルタミン酸の割合は35~90質量%が好ましい。

【0021】但し、本発明において全アミノ酸とは、ペプトンや酵母エキス等の通常培地に用いられる窒素源に含まれていることが知られているアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、ヒスチジン、チロシン及びバリンからなる16種類の遊離型アミノ酸の集合を指すものとする。該16種類の遊離型アミノ酸の合計量は、ペプトンや酵母エキス等に含まれる総ての遊離型アミノ酸量を概ね示すものとしてしばしば用いられるものである。

【0022】さらに、本発明に用いる培地には、通常の微生物培養に必要とされる炭素源が添加されていて良い。炭素源としては、トレハロース、シュークロース等の糖類が挙げられる。また瓈糖蜜、デンプン分解物、チーズホエー等の農産廃棄物を用いることもできる。これらの炭素源の添加濃度は、本発明の効果を達成する範囲で有れば特に限定されないが、より優れた菌の増殖促進効果を呈することから培地に対して0.001~5質量%が好ましい。ただし、胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢を形成させるためには、グルコースの存在は好ましくなく、培地に含まれるグルコース濃度は培地に対して0.01質量%以下とすることが好ましい。

【0023】本発明に用いる培地には、必要に応じてリン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム等のリン酸塩又はそのナトリウム塩等の無機塩が添加されていても良い。該無機塩の添加濃度は、本発明の効果を達成する範囲であれば特に制限されないが、培地に対して1質量%以下が好ましい。

【0024】さらにピルビン酸を培地に加えることでより優れた菌の増殖と胞子囊化率を得ることができる。本発明で言うピルビン酸にはピルビン酸の生理学的に許容される塩を含む。具体的にピルビン酸の生理学的に許容される塩としてはピルビン酸ナトリウム、ピルビン酸カリウム等が挙げられる。

$$(式1) \quad \text{胞子囊化率} (\%) = [(\text{胞子囊数}) \div (\text{菌数})] \times 100$$

【0031】これに対し、本発明の製造方法によれば、胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポビリエの胞子嚢を5~50%の胞子囊化率で製造することが可能である。また、液体培養により培養液1ml当たり、胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢の数を $5 \times 10^7$ 以上、通常 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ 個で製造することが可能である。

【0032】バチルス・ポビリエ (*Bacillus*

【0025】ピルビン酸の濃度は培地に対して0.01~0.5質量%であり、より優れた菌の増殖及び胞子囊化率を呈する点で好ましくは培地に対して0.03~0.3質量%である。添加されるピルビン酸は、培地成分と共に殺菌しても良いし、培地成分と分けて殺菌して培養開始時に添加しても良い。

【0026】本発明の製造方法に用いる培地は液体培地であっても固体培地であっても良い。本発明の製造方法を液体培地に適用する際、水も培地成分として含まれるものとする。また、本発明の製造方法を固体培地に適用する際に用いる基材としては、例えば寒天等の多糖類が好ましく挙げられる。該基材の培地中の濃度は0.5~5質量%であり、より優れた菌の増殖促進効果を呈することから1~3質量%が好ましい。

【0027】本発明に用いるバチルス・ポビリエに属する菌の増殖に適した温度は25~32°Cである。また、pHは6.5~8.5でありより好ましくは7~8である。pHの調整には各種の緩衝液や塩酸又は硫酸など通常用いられる酸、あるいは水酸化ナトリウム、水酸化カリウム又はアンモニアなど通常用いられるアルカリを使用することができる。

【0028】液体培養は、回分培養、連続培養、半回分培養又は流加培養など、いずれの方法でも良い。培養時間は培養方法、培養温度、培養pH又は接種菌体量によって異なるが、通常、回分培養の場合で5~10日である。

【0029】培養終了後に培養物から胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢を回収する方法としては、固体培養の場合には該胞子嚢を含んだ菌体が培地の表面にあることから、水あるいはリン酸緩衝液、Tris-HCl等の緩衝液を添加して懸濁させて該菌体を洗い流し、その後、遠心分離や渦過等の一般的な方法で分離、回収すればよい。液体培養の場合には、培養液から遠心分離や渦過等の一般的な分離方法で該胞子嚢を含む菌体を分離し、回収すればよい。この際、必要に応じて水や緩衝液を使った洗浄操作を加えてもよい。

【0030】従来の培地での培養では、コガネムシ科昆虫に防除効果を有する胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポビリエの胞子嚢は殆ど得られず、式1の胞子囊化率で示される、菌数あたりの胞子囊数の割合は0.05%未満である。

*popilliae*)に属する菌株の中でもコガネムシ科昆虫の幼虫に生育阻害若しくは殺虫活性を示す菌種としては、バチルス・ポビリエ・セマダラ (*Bacillus popilliae Semadara*, FERM P-16818)、バチルス・ポビリエ・マメ (*Bacillus popilliae var. popilliae Mame*, FERM P-17661)、バチルス・ポビリエ・ヒメ (*Bacillus*

*popilliae* var. *popilliae* Hime、FERM P-17660)、バチルス・ボビリエ・サクラ (*Bacillus popilliae* var. *popilliae* Sakura、FERM P-17662)、バチルス・ボビリエ・デュトキ (*Bacillus popilliae* Dutky、ATCC No. 14706)、バチルス・ボビリエ・メロロンサ (*Bacillus popilliae* subsp. *melolonthae*) 等が挙げられる。

【0033】本発明の製造方法により得られた胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ボビリエの胞子嚢はコガネムシ科昆虫に殺虫活性又は幼虫の生育抑制等の防除効果を示す。このため該胞子嚢はコガネムシ科昆虫の防除剤として有用である。

【0034】防除対象のコガネムシ科昆虫は、ドウガネブイブイ (*Anomala cuprea*)、セマグラコガネ (*Blitopertha orientalis*)、マメコガネ (*Popillia japonica*)、ウスチャコガネ (*Phyllopertha diversa*)、チャイロコガネ (*Adoretus enuimaculatus*)、ヒメコガネ (*Anomala rufocuprea*) 等が挙げられる。

【0035】本発明の製造方法により製造した胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢は、それらを懸濁した液のまま昆虫、特にコガネムシ科昆虫の防除剤として用いても良く、あるいは乾燥して粉末にして散布しても良い。また乾燥した後、水あるいは緩衝液の懸濁液として散布しても良い。更に該胞子嚢を農薬に用いられる公知慣用の担体、固着剤、分散剤、凍結防止剤、増粘剤又は栄養剤等の各種の添加剤と共に通常の微生物農薬の製造方法に従って、粉剤、粒剤、水和剤、乳剤、液剤、フロアブル又は塗布剤等に製剤化しても良い。また本発明の製造方法により得られる胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢を他の微生物製剤に混合して使用することも可能である。

【0036】前記防除剤に含まれる胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢の含有割合は、前記防除剤の形状と使用方法により異なるが、通常0.0001~100質量%が好ましい。

【0037】施用方法としては、剤型や使用方法等または対象作物等によって適宜選択され、例えば、地上液剤散布、地上固体散布、空中液剤散布、空中固体散布、施設内施用、土壤混和施用又は土壤灌注施用等の方法を挙

げることができる。また、他の薬剤、すなわち殺虫剤、殺線虫剤、殺ダニ剤、除草剤、殺菌剤、植物生長調節剤、肥料又は土壤改良資材（泥炭、腐植酸資材又はポリビニルアルコール系資材等）等と混合して施用、あるいは混合せずに交互施用または同時施用することも可能である。

【0038】前記防除剤の施用量は、コガネムシ科昆虫の種類、適用植物の種類及び剤型等によって異なるため一概には規定できないが、例えば、地上散布する場合、本発明の胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢の施用量が、 $10^{10} \sim 10^{15}$  個/a、好ましくは $10^{11} \sim 10^{14}$  個/a程度となるようにすればよい。

【0039】

【実施例】以下、実施例及び試験例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

【0040】（参考例1）各実施例で調製した培地の培地成分として使用したペプトン、酵母エキス及びラクトアルブミン水解物中の遊離型アミノ酸含有量をオルトタルタルアルデヒド（OPA）を用いたポストカラム法により測定した。

【0041】（1）試料の調製

標準試料としてアミノ酸混合標準液H型（和光純薬社製、各アミノ酸2.5mmol/lを含む）を0.02M塩酸で5倍希釈し、ボアサイズ0.2μmのフィルターで済過し、標準試料溶液を調製した。

【0042】測定試料は、ペプトンとして「ポリペプトンS」（日本製薬社製）、「トリップトン」（ディフコ社製）のものを、酵母エキスとしてオクソイド社製、ディフコ社製のものを、及びラクトアルブミン水解物（和光純薬社製）を用い、1.0質量%溶液を各々調製し、これらを1.0質量%トリクロロ酢酸水溶液で2倍希釈、よく攪拌した後、遠心分離により不溶性沈殿を除去した。その後、上清をボアサイズ0.2μmのフィルターで済過して各測定試料溶液を調製した。

【0043】（2）分析

標準試料溶液、各測定試料溶液の10μlを高速液体クロマトグラフィーに注入し、アミノ酸分析を行った。なお、分析は日立製作所製のアミノ酸自動分析装置「La Chrom」を使用し、図2に示した流路図に基づいて行った。なお、該アミノ分析に用いたOPA標識用反応液及び溶離液の組成を表1及び2に記載した。

【0044】

【表1】

OPA標識用反応液の組成	R1	R2	R3
ホ酸		21.6g	21.6g
水酸化ナトリウム	24.0g		
25%Brij-35 溶液		4.0ml	4.0ml
オルガニックヒドロアルコール			800mg/10ml
2-メチルブタノール			2.0ml
5%次亜塩素酸ナトリウム溶液	150.0 μl		
全量(蒸留水で1.0Lとした)	1.0L	1.0L	1.0L

【0045】試薬は全て和光純薬社製特級品を使用した。

【0046】  
【表2】

溶媒液の組成	A	B	C
クエン酸ナトリウム2H <sub>2</sub> O	8.14g	26.67g	
塩化ナトリウム	7.07g	54.35g	
クエン酸H <sub>2</sub> O	20.00g	6.10g	
水酸化ナトリウム			8.0g
エチルアルコール		110ml	
カプリル酸	0.1ml	0.1ml	0.1ml
全量(蒸留水で1.0Lとした)	1.0L	1.0L	1.0L

【0047】試薬は全て和光純薬社製を使用し、クエン酸ナトリウム2H<sub>2</sub>O、クエン酸H<sub>2</sub>O、カプリル酸はアミノ酸分析用、その他は特級品を使用した。

るL-グルタミン酸及び全アミノ酸の含有率を算出し表3に示した。

【0048】標準試料溶液及び各測定試料溶液より得られたピークエリアから換算して、各測定試料中に含まれ

【0049】

【表3】

	ペプトン		酵母エキス		ラクトルミン 水解物
	ボリペプトンS	トリペプトン	オソイト社製	ディップ社製	
グルタミン酸含有率 (質量%)	0.70	1.27	7.74	7.48	2.56
全アミノ酸の合計の含有率(質量%)	17.88	21.65	36.67	31.45	27.37

【0050】(参考例2)ハイネスらに記載の培地条件(Journal of Invertebrate Pathology, 22巻, 377-381頁, 1973年)、即ち、ペプトン0.5質量%、酵母エキス1.5質量%、リン酸水素二カリウム0.3質量%、グルコース0.1質量%及び活性炭1質量%を含む液体培

地で、市販されている各ペプトン、酵母エキスの各組合せにおける培地中のグルタミン酸の含有率、および全アミノ酸中に含まれるグルタミン酸の含有率を計算し、表4に示した。

【0051】

【表4】

	使用したペプトン 0.5 質量%	使用した酵母エキス 1.5 質量%	培地中のグルタミン酸 の含有率 (質量%)	全アミノ酸に対する グルタミン酸の 含有率(質量%)
No. 1	ポリペプトンS	オクソイト社製	0.12	18.70
No. 2	ポリペプトンS	ディフコ社製	0.12	20.62
No. 3	トリプトン	オクソイト社製	0.12	18.57
No. 4	トリプトン	ディフコ社製	0.12	20.44

【0052】培地中のグルタミン酸の含有率は、市販の最もグルタミン酸濃度が高いペプトンと酵母エキスを用いた場合、すなわちペプトン（ディフコ社製「トリプトン」）と酵母エキス（オクソイド社製）を用いた場合の0.12質量%であった。

【0053】また、同様に全アミノ酸中に含まれるグルタミン酸の含有率は、市販の最も全アミノ酸中に含まれるグルタミン酸の高いペプトンと酵母エキスを用いた場合、すなわちペプトン（日本製薬社製「ポリペプトンS」）と酵母エキス（ディフコ社製）を用いた場合の20.6質量%であった。

【0054】（実施例1、比較例1） 固体培地の調製 フラスコに蒸留水80gを入れ、L-グルタミン酸（和

光純薬社製特級）、吸着剤、ペプトン（日本製薬社製「ポリペプトンS」）、酵母エキス（オクソイド社製）、トレハロース二水和物（和光純薬社製特級）、寒天（和光純薬社製特級）を表5に示した量、混合した。さらに攪拌しながら1m o 1/1の水酸化カリウム水溶液を加えてpHを8.0に調整した。さらに蒸留水を加えて最終的に100gとし、実施例として培地（A-1）及び（A-2）を、比較例として（B-1）～（B-4）を調製した。なお、吸着剤として用いた活性炭は和光純薬社製特級、および合成吸着樹脂は三菱化学社製「DIAION HP20」を使用した（以下同様）。

#### 【0055】

【表5】

培地名	実施例			比較例		
	A-1	A-2	B-1	B-2	B-3	B-4
L-グルタミン酸 (g)	0.5	0.5	0.5	—	—	—
培地	吸着剤 (g)	活性炭 0.1	合成吸 着樹脂 2.0	—	活性炭 0.1	合成吸 着樹脂 2.0
成 分	ペプトン (g)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	酵母エキス (g)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	トレハロース二水和物 (g)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	寒天	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
全量(g) (蒸留水で100gとした)	100					

【0056】参考例1をもとに、培地に対するグルタミン酸の含有率及び全アミノ酸に対するグルタミン酸の割合をそれぞれ求め、結果を表6及び表7に記載した。

【0057】（実施例2、比較例2） 固体培地を用いた培養例

各培地を121℃、20分間のオートクレーブで殺菌し、寒天が固化しないうちに十分攪拌して直径9cmのプラスチックシャーレに20mlずつ分注して平板培地を作製した。

【0058】バチルス・ボビリエ・セマダラ及びバチルス・ボビリエ・サクラの種菌は、乳化病感染コガネムシ

幼虫から採取した胞子嚢を用いた。胞子嚢数を顕微鏡による直接検鏡で計測し、蒸留水にて胞子嚢の濃度が1×10<sup>7</sup>個/mlとなるよう胞子嚢液を調製した。これをプラスチックチューブに0.5ml取り、ヒートブロックで70℃、20分間の加熱処理を行った。該種菌の50μlを上記で調製した平板培地に塗布し、30℃の培養装置内にて8日間培養した。

【0059】培養終了後、シャーレに蒸留水2mlを滴下して、発生したコロニーをよく懸濁し、菌体を回収した。胞子嚢数、及び菌数を顕微鏡による直接検鏡で計測し、式1を用いて胞子嚢化率を算出した。表6及び表7

に各菌株のシャーレ1枚当たりの胞子叢数及び胞子叢化率を示す。

【0060】  
【表6】

バチルス・ポビリエ・セマグラの培養

培地名	培地に対する グルタミン酸の含有率 (質量%)	全アミノ酸に対する グルタミン酸の割合 (質量%)	胞子叢数 (個/シャーレ)	胞子叢化率 (%)
A-1	0.54	70.16	$2.5 \times 10^9$	42
A-2	0.54	70.16	$1.0 \times 10^9$	37
B-1	0.54	70.16	0	0
B-2	0.04	15.47	$5.0 \times 10^8$	13
B-3	0.04	15.47	$2.0 \times 10^8$	11
B-4	0.04	15.47	0	0

## 【0061】

## 【表7】

バチルス・ポビリエ・サクラの培養

培地名	培地に対する グルタミン酸の含有率 (質量%)	全アミノ酸に対する グルタミン酸の割合 (質量%)	胞子叢数 (個/シャーレ)	胞子叢化率 (%)
A-1	0.54	70.16	$3.5 \times 10^9$	40
A-2	0.54	70.16	$2.0 \times 10^9$	25
B-1	0.54	70.16	0	0
B-2	0.04	15.47	$1.0 \times 10^9$	18
B-3	0.04	15.47	$7.0 \times 10^8$	9
B-4	0.04	15.47	0	0

【0062】表6及び表7の結果から、各菌株とも吸着剤の存在下、グルタミン酸を添加した培地で培養した場合の方が胞子叢数及び胞子叢化率が高かった。

【0063】(実施例3、比較例3) 液体培地の調製 フラスコに蒸留水700gを入れ、添加するアミノ酸としてL-グルタミン酸(和光純薬社製特級)又はL-アラニン(和光純薬社製特級)を、さらにペプトン(日本製薬社製「ポリペプトンS」)、酵母エキス(オクソイド社製)及びトレハロース二水和物(和光純薬社製特級)を表8に示した量、混合した。さらに攪拌しながら5mo1/1の水酸化カリウム水溶液を添加してpHを7.6に調整し、更に蒸留水を加えて最終的に850gとした。この培地を、pH電極を備えた発酵槽(丸菱バ

イオエンジ社製)に移し、121℃、60分間のオートクレーブ滅菌を行った。

【0064】次に、フラスコに活性炭素粉末(和光純薬社製特級)を表8に示した量添加し、さらに蒸留水を加えて100gとし活性炭分散液を調製した。また、フラスコに消泡剤(日本油脂社製「ディスホームCA-123」)を表8に示す量添加し蒸留水を添加して50gとし消泡剤液を調製した。活性炭分散液及び消泡剤液を滅菌し、その後発酵槽に無菌的に加え、実施例として培地(C-1)を、比較例として培地(D-1)～(D-3)を調製した。

## 【0065】

## 【表8】

培地名	実施例		比較例		
	C-1	D-1	D-2	D-3	
培地成分	添加したアミノ酸 5 g	L-グルタミン酸	L-グルタミン酸	—	L-アラニン
	活性炭(g)	3	—	3	3
	トリプトン(g)	5	5	5	5
	酵母エキス(g)	5	5	5	5
	トレハロース二水和物(g)	5	5	5	5
	消泡剤(g)	1	1	1	1
全量(g) (蒸留水で1000gとした)	1000				

【0066】(比較例4)「ハイネスら (Journal of Invertebrate pathology, 22巻, 1973年, 377-381頁)」と比較するため、フラスコに蒸留水80gを入れ、さらにペプトン(ディフコ社製「トリプトン」)、酵母エキス(オクソイド社製)、リン酸水素二カリウム(和光純薬社製特級)、グルコース(和光純薬社製特級)及び活性炭素粉末(和光純薬社製特級)を表9に示した量、混合した。更に蒸留水を加えて最終的に100gとした。これを培地(D-4)と称する。121℃、20分間のオートクレーブ殺菌を行った。

【0067】

【表9】

培地名	比較例	
	D-4	
培地成分	添加したアミノ酸	—
	活性炭(g)	1.0
	トリプトン(g)	0.5
	酵母エキス(g)	1.5
	グルコース(g)	0.1
	リン酸水素二カリウム(g)	0.3
全量(g) (蒸留水で100gとした)	100	

#### バチルス・ポビリエ・セマダラの培養

培地名	培地に対する グルタミン酸の含有率 (質量%)	全アミノ酸に対する グルタミン酸の割合 (質量%)	胞子囊数 (個/ml)	胞子囊化率 (%)
C-1	0.54	70.16	$1.2 \times 10^8$	6.0
D-1	0.54	70.16	0	0
D-2	0.04	15.47	0	0
D-3	0.04	5.76	0	0
D-4	0.12	18.60	0	0

【0072】

【表11】

【0068】(実施例4、比較例5) 液体培地を用いた培養例

バチルス・ポビリエ・セマダラ、バチルス・ポビリエ・サクラ及びバチルス・ポビリエ・マメの種菌として、各々予め活性炭を含む培地(A-1)を用いた培養で作製した胞子囊を使用した。無菌的に回収した胞子囊を顕微鏡による直接検鏡で計測し、蒸留水にて胞子囊の濃度が $1 \times 10^9$  個/mlとなるように胞子囊液を調製した。

【0069】各菌株の胞子囊液を1mlずつプラスチックチューブに分注し、ヒートブロックで70℃、20分間の加熱処理を行った。培地(C-1)及び(D-1)～(D-3)には胞子囊液を各1ml接種し、攪拌150rpm、通気1vvm、30℃、pH7.6制御の条件で7日間培養した。一方、培地(D-4)は胞子囊液を0.01ml接種し、30℃の培養装置内にて100rpmの回転数で攪拌して7日間培養した。

【0070】培養終了後、培養液中の単位容積当たりの胞子囊数及び菌数を顕微鏡による直接検鏡で計測し、式1を用いて胞子囊化率を算出した。表10～12に培養液1mlあたりの胞子囊数と胞子囊化率を示す。

【0071】

【表10】

## バチルス・ポビリエ・サクラの培養

培地名	培地に対する グルタミン酸の含有率 (質量%)	全アシ酸に対する グルタミン酸の割合 (質量%)	胞子叢数 (個/ml)	胞子叢化率 (%)
C-1	0.54	70.16	$1.5 \times 10^8$	6.8
D-1	0.54	70.16	0	0
D-2	0.04	15.47	0	0
D-3	0.04	5.76	0	0
D-4	0.12	18.60	0	0

【0073】

【表12】

## バチルス・ポビリエ・マメの培養

培地名	培地に対する グルタミン酸の含有率 (質量%)	全アシ酸に対する グルタミン酸の割合 (質量%)	胞子叢数 (個/ml)	胞子叢化率 (%)
C-1	0.54	70.16	$1.6 \times 10^8$	7.2
D-1	0.54	70.16	0	0
D-2	0.04	15.47	0	0
D-3	0.04	5.76	0	0
D-4	0.12	18.60	0	0

【0074】表10～12の結果から明らかなように吸着剤とグルタミン酸とを添加した培地においてのみ胞子叢が得られた。

【0075】(実施例5、比較例6) 液体培地の調製例

ビーカーに蒸留水700gを入れ、L-グルタミン酸(和光純薬社製特級)、ペプトン(日本製薬社製「ポリペプトンS」)、酵母エキス(オクソイド社製)、ラクトアルブミン水解物(和光純薬社製)、トレハロース二水和物(和光純薬社製特級)を表13に示した量、混合した。攪拌しながら5m o 1/1の水酸化カリウム水溶液を添加してpHを7.6に調整し、更に蒸留水を加えて850gとした。この培地を、pH電極を備えた発酵槽(丸菱バイオエンジ社製)に移し、121℃、60分

間のオートクレーブ滅菌を行った。

【0076】次に、フラスコに活性炭素粉末(和光純薬社製特級)を表13に示した量添加し、蒸留水を加えて100gとして活性炭分散液を調製した。また、フラスコに消泡剤(日本油脂社製「ディスホームCA-123」)を表13に示した量添加し、さらに蒸留水を加えて50gとし消泡剤液を調製した。該活性炭分散液及び消泡剤液を滅菌し、その後各発酵槽に無菌的に加え、さらに蒸留水を加え最終的に1000gとし、実施例として培地(E-2)～(E-6)、比較例として培地(E-1)及び(E-7)を調製した。

【0077】

【表13】

培地名	比較例 E-1	実施例					比較例 E-7	
		E-2	E-3	E-4	E-5	E-6		
培地成分	L-グルタミン酸 (g)	-	0.2	0.5	0.8	1.5	3.0	5.0
	活性炭 (g)	3	3	3	3	3	3	3
	ペプトン (g)	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
	酵母エキス (g)	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
	ラクトアルブミン水解物 (g)	5	5	5	5	6	6	5
	トレハロース二水和物 (g)	5	5	5	5	5	5	5
	消泡剤 (g)	1	1	1	1	1	1	1
全量 (g) (蒸留水で1000gとした)		1000						

【0078】(実施例6、比較例7) 液体培地を用いた培養例

バチルス・ボビリエ・セマダラの種菌として、各々予め活性炭を含む培地(A-1)を用いた培養で作製した胞子嚢を使用した。無菌的に回収した胞子嚢を顕微鏡による直接検鏡で計測し、蒸留水にて胞子嚢の濃度が $1 \times 10^9$ 個/m<sup>l</sup>となるように胞子嚢液を調製した。

【0079】胞子嚢液を1m<sup>l</sup>ずつプラスチックチューブに分注し、ヒートブロックで70°C、20分間の加熱処理を行った。これを各培地に1m<sup>l</sup>接種し、攪拌15

0 rpm、通気1vvm、30°C、pH7、6制御の条件で7日間培養した。培養終了後、培養液中の単位容積当たりの胞子嚢数及び菌数を顕微鏡による直接検鏡で計測し、式1を用いて胞子嚢化率を算出した。表14に培養液1m<sup>l</sup>あたりの菌体数と胞子嚢数と胞子嚢化率を示す。また、図3に培地に対するグルタミン酸濃度(質量%)と菌数( $\times 10^9$ 個/ml)及び胞子嚢数( $\times 10^7$ 個/ml)の関係を示す。

【0080】

【表14】

培地名	培地に対する グルタミン酸の含有率 (質量%)	全グルタミン酸に対する グルタミン酸の割合 (質量%)	菌体数 (個/ml)	胞子嚢数 (個/ml)	胞子嚢化率 (%)
E-1	0.08	13.94	$5.8 \times 10^8$	0	0
E-2	0.28	37.01	$6.9 \times 10^8$	$9.6 \times 10^7$	14.0
E-3	0.58	55.08	$1.1 \times 10^9$	$1.8 \times 10^8$	17.0
E-4	0.88	65.09	$1.3 \times 10^9$	$1.7 \times 10^8$	12.7
E-5	1.58	77.03	$6.8 \times 10^8$	$9.2 \times 10^7$	13.5
E-6	3.08	86.75	$4.6 \times 10^8$	$5.2 \times 10^7$	11.2
E-7	5.08	91.53	$3.5 \times 10^8$	0	0

【0081】(実施例7、比較例8) 液体培地の調製

例

ビーカーに蒸留水700gを入れ、L-グルタミン酸(和光純薬社製特級)、ビルビン酸ナトリウム(和光純薬社製特級)、ペプトン(日本製薬社製「ポリペプトンS」)、酵母エキス(オクソイド社製)、ラクトアルブミン水解物(和光純薬社製)、トレハロース二水和物(和光純薬社製特級)を表15に示す量、混合した。統いて、攪拌しながら4mol/lの水酸化ナトリウム水溶液を添加してpHを7.6に調製し、更に蒸留水を加えて最終的に850gとした。調製した培地をpH電極を備えた発酵槽(丸菱バイオエンジ社製)に入れて12

1°C、50分のオートクレープ殺菌を行なった。

【0082】次に、フラスコに活性炭素粉末(和光純薬社製特級)を表15に示す量添加し、さらに蒸留水を加えて100gとし活性炭分散液を調製した。また、フラスコに消泡剤(日本油脂社製「ディスホームCA-123」)を表15に示す量添加し、さらに蒸留水を加えて50gとし消泡剤液を調製した。該活性炭分散液及び消泡剤液を滅菌し、その後発酵槽に無菌的に加え、実施例として培地(F-1)及び(F-2)を、比較例として培地(F-3)を調製した。

【0083】

【表15】

培地名	実施例		比較例	
	F-1	F-2	F-3	
培地成成分	L-グルタミン酸 (g)	5.0	5.0	-
	ビルビン酸ナトリウム (g)	1.0	2.5	1.0
	活性炭 (g)	2.5	2.5	2.5
	ペアト (g)	7.5	7.5	7.5
	酵母エキス (g)	7.5	7.5	7.5
	ラクトアルブミン水解物 (g)	5	5	5
	トレハロース二水和物 (g)	5	5	5
消泡剤		1	1	
全量(g) (蒸留水で1000gとした)		1000		

【0084】(実施例8、比較例9) 液体培地を用いた培養例

実施例6と同様にしてバチルス・ポビリエ・セマダラを種菌として用い、培地(F-1)～(F-3)に各1m<sup>1</sup>ずつ無菌的に植菌して培養を開始した。培養条件は温度29℃、通気量0.5vvm、回転数150rpmとし、培養中は4mol/lの水酸化ナトリウム溶液及び

4mol/lの硫酸水溶液にてpH7.6に制御した。

【0085】培養を5日間行い、培養液中の単位容積当たりの胞子数及び菌数を顕微鏡による直接検鏡で計測し胞子発化率を算出した。表16に培地(F-1)～(F-3)の菌数、胞子数、胞子発化率を示した。

【0086】

【表16】

培地名	培地に対するグルタミン酸の含有率 (質量%)	全アノ酸に対する グルタミン酸の 割合(質量%)	ビルビン酸含有 率(質量%)	菌数 (個/ml)	胞子数 (個/ml)	胞子発 化率(%)
F-1	0.58	55.08	0.08	1.5×10 <sup>9</sup>	2.5×10 <sup>8</sup>	16.7
F-2	0.58	55.08	0.20	1.6×10 <sup>9</sup>	4.8×10 <sup>8</sup>	30.0
F-3	0.06	15.47	0.08	1.0×10 <sup>9</sup>	0	0

【0087】ビルビン酸ナトリウムを添加しかつpHを制御することで高い胞子発化率となり、かつ得られた胞子数も高かった。

【0088】(生物試験例1) 本発明の製造方法により得られた胞子によるコガネムシ科昆虫の幼虫の生育抑制効果試験を行った。実施例2の培地(A-1)を用いた培地で取得したバチルス・ポビリエ・セマダラの胞子を蒸留水に2×10<sup>8</sup>個/m<sup>1</sup>となるよう懸濁させ懸濁液(I)を調製した。さらに、実施例2の培地(A-1)を用いた培地で取得したバチルス・ポビリエ・セマダラの胞子を含む懸濁液をフレンチプレス処理し、胞子から胞子とパラスピラルボディとを分離し取り出した。分離した胞子を蒸留水に2×10<sup>8</sup>個/m<sup>1</sup>となるよう懸濁させ懸濁液(II)を調製した。また、分離したパラスピラルボディを蒸留水に2×10<sup>8</sup>個/m<sup>1</sup>となるよう懸濁させ懸濁液(III)を調製した。

【0089】腐葉土を約20gずつ入れた直径6cmのプラスチックカップを80個準備した。

i) プラスチックカップ20個に対し、胞子数が2×10<sup>8</sup>個/カップとなるように胞子を含む懸濁液(I)を散布した。

ii) プラスチックカップ20個に対し、胞子数が2×10<sup>8</sup>個/カップとなるように胞子のみを含む懸濁液(II)を散布した。

iii) プラスチックカップ20個に対し、パラスピラルボディ数が2×10<sup>8</sup>個/カップとなるようにパラスピラルボディのみを含む懸濁液(III)を散布した。

iv) 残りの20個には何も散布せず、対照試験とした。それぞれのカップにドウガネブイブイ2令幼虫を1頭ずつ入れ、25℃の培養装置内で30日間飼育し、経時に幼虫の死亡率と生存幼虫の平均体重の増加量を測定した。累積死亡率について表17に示し、生育抑制効果について図4に結果を示す。

【0090】

【表17】

試験区	累積死亡率 (%)		
	11日目	23日目	30日目
i)	20	40	45
ii)	0	5	10
iii)	15	20	25
対 照	0	0	0

【0091】以上の結果から胞子とパラスピラルボディとを含む胞子嚢が優れた殺虫効果及び幼虫の生育抑制効果を有することが確認された。

【0092】(生物試験例2) 本発明の製造方法(固体培養)により得られた胞子嚢によるコガネムシ科昆虫の殺虫試験を行った。

【0093】実施例2の活性炭含有平板培地(A-1)を用いた培養で取得したバチルス・ポビリエ・セマダラの胞子嚢を蒸留水に $1 \times 10^9$ 個/m<sup>l</sup>となるよう懸濁し胞子嚢液を調製した。直径6cmのプラスチックカップ40個に腐葉土を約20gずつ入れ、そのうちの20

個に対して、胞子嚢数が $1 \times 10^9$ 個/カップとなるよう胞子嚢液を散布した。残りの20個には胞子嚢液を散布せず、対照試験とした。それぞれのカップにドウガネブイブイ2令幼虫を1頭ずつ入れ、25°Cの培養装置内で40日間飼育し、経時的に死亡個体数を調べ、累積死亡率(%)を求めた。

【0094】表18に本発明の固体培養で得られた胞子嚢のドウガネブイブイに対する殺虫活性を示す。40日目では100%の死亡率が観察された。

【0095】

【表18】

試験区	累積死亡率 (%)			
	10日目	20日目	30日目	40日目
対 照	0	0	0	0
胞子嚢添加	40	60	90	100

【0096】(生物試験例3) 本発明の製造方法(液体培養)により得られた胞子嚢によるコガネムシ科昆虫の殺虫試験を行った。生物試験例2と同様にして試験区を作製した。ただし、散布した胞子嚢は

i) 実施例4の活性炭含有液体培地(C-1)を用いた培養で取得したバチルス・ポビリエ・セマダラの胞子嚢、

ii) 実施例4の活性炭含有液体培地(C-1)を用いた培養で取得したバチルス・ポビリエ・マメの胞子嚢、

であった。それぞれのカップにドウガネブイブイ2令幼虫を1頭ずつ入れ、25°Cの培養装置内で40日間飼育し、経時的に死亡個体数を調べ、累積死亡率(%)を求めた。

【0097】表19に本発明の液体培養で得られた胞子嚢のドウガネブイブイに対する殺虫活性を示す。40日目では85~100%の死亡率が観察された。

【0098】

【表19】

試験区	累積死亡率 (%)			
	10日目	20日目	30日目	40日目
対 照	0	0	0	0
i)	15	30	95	100
ii)	10	35	65	85

【0099】(生物試験例4) 本発明の製造方法(液体培養)により得られた胞子嚢によるコガネムシ科昆虫の殺虫試験を行った。実施例8に示した培地(F-2)の培養により得たバチルス・ポビリエ・セマダラ株の胞子嚢を蒸留水に $1 \times 10^9$ 個/m<sup>l</sup>となるよう懸濁し胞子嚢液を調製した。

【0100】直径6cmのプラスチックカップ40個に腐葉土20gずつを入れた。そのうちの20個に対して、胞子嚢数が $1 \times 10^9$ 個/カップとなるよう胞子嚢液を散布した。残りの20個には胞子嚢液を散布せず、対照試験とした。それぞれのカップにドウガネブイブイ2令幼虫を1頭ずつ入れ、25°Cの培養装置内で40日

間飼育し、経時に死亡個体数を調べ、累積死亡率(%)を調べた。

【0101】表20にドウガネブイブイに対する昆虫体外形成胞子嚢の殺虫活性の結果を示す。得られた胞子嚢

は殺虫活性を示し40日目までに全ての幼虫が死亡した。

【0102】

【表20】

試験区	累積死亡率 (%)			
	10日目	20日目	30日目	40日目
対照	0	0	0	0
胞子嚢添加	15	30	95	100

【0103】

【発明の効果】本発明は胞子とパラスピラルボディとを含むバチス・ポビリエの胞子嚢を効率良く得る製造方法を提供できる。すなわち、本発明は5~10日程度の液体培地で、胞子とパラスピラルボディとを含むバチス・ポビリエの胞子嚢を5~50%の胞子嚢化率で製造することができ、また、培養液1ml当たり、胞子とパラスピラルボディとを含む胞子嚢を5×10<sup>7</sup>個以上の割合で製造することができる。また本発明は昆虫、特にコガネムシ科昆虫に殺虫又は幼虫の生育阻害等の防除効果を示す防除剤及び該防除剤を用いた昆虫、特にコガネムシ科昆虫の防除方法を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 胞子とパラスピラルボディとを含むバチス・ポビリエの胞子嚢の模式図である。

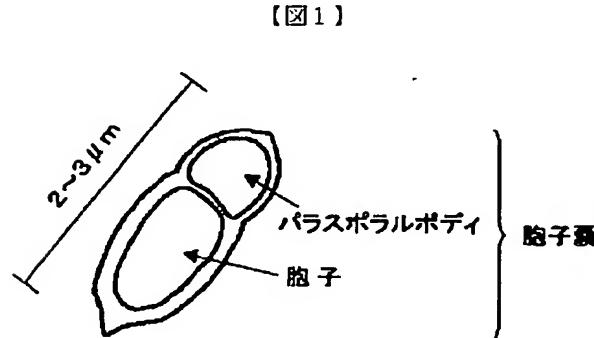
【図2】 アミノ酸分析に用いた高速液体クロマトグラフィーシステムの模式図である。

【図3】 実施例3における培地中のグルタミン酸濃度に対する胞子嚢数及び菌体数を示したグラフである。

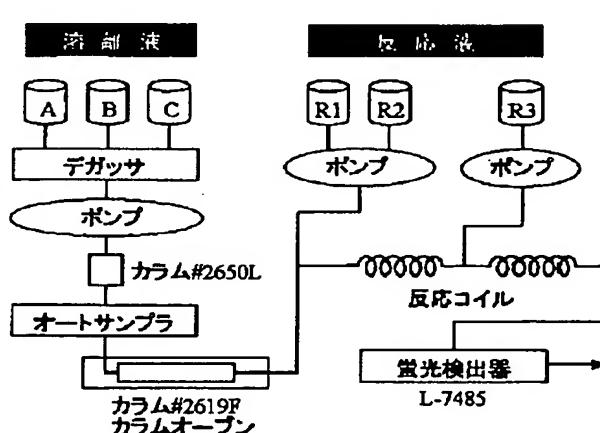
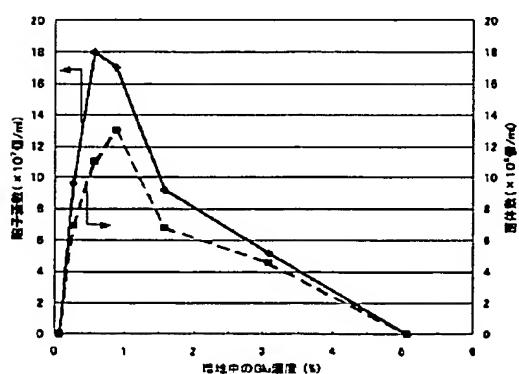
【図4】 生物試験例1におけるドウガネブイブイの生育阻害効果を示したグラフである。

【符号の説明】

- 1 胞子嚢
- 2 パラスピラルボディ
- 3 胞子

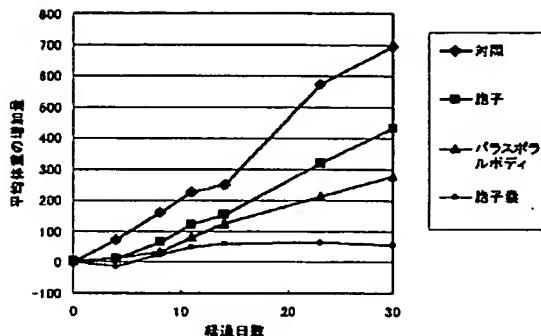


【図3】



【図2】

【図4】



## 【手続補正書】

【提出日】平成14年7月2日(2002.7.2)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0032】バチルス・ポビリエ (*Bacillus popilliae*) に属する菌株の中でもコガネムシ科昆虫の幼虫に生育阻害若しくは殺虫活性を示す菌種としては、バチルス・ポビリエ・セマダラ (*Bacillus popilliae Semadara*, FERM BP-8068)、バチルス・ポビリエ・マメ (*Bacillus popilliae var. popilliae Mame*, FERM BP-8069)、バチルス・ポビリエ・ヒメ (*Bacillus popilliae var. popilliae Hime*, FERM P-17660)、バチルス・ポビリエ・サクラ (*Bacillus popilliae var. popilliae Sakura*, FERM

P-17662)、バチルス・ポビリエ・デュトキ (*Bacillus popilliae Dutky*, ATCC No. 14706)、バチルス・ポビリエ・メロロンサ (*Bacillus popilliae subsp. melolonthae*) 等が挙げられる。なお、バチルス・ポビリエ・セマダラは、平成10年5月21日に工業技術院生命工学工業技術研究所（現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター）に受託番号 FERM P-16818で寄託され、平成14年5月21日にブタベスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号 FERM BP-8068が付与されている。また、バチルス・ポビリエ・マメは、平成11年11月25日に工業技術院生命工学工業技術研究所（現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター）に受託番号 FERM P-17661で寄託され、平成14年6月10日にブタベスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号 FERM BP-8069が付与されている。

## フロントページの続き

(72)発明者 西橋 秀治

千葉県佐倉市大崎台2-23-9

(72)発明者 藤家 桂

千葉県長生郡睦沢町上市場256-3

(72)発明者 青柳 森一

千葉県香取郡山田町府馬1740

(72)発明者 長谷川 誠

千葉県千葉市緑区椎名崎町486 コープシティ  
おゆみ野E-503

(72)発明者 田中 正男

千葉県千葉市美浜区高浜6-11-12

(72)発明者 横山 とも子

千葉県千葉市美浜区磯辺5-10 1-1206

F ターム(参考) 4B065 AA15X AC12 AC20 BB08

BB12 BB40 CA48

4H011 AC01 BB21 DA15 DD03 DD04

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**